

**А.И. Жебентяев, А.К. Жерносек,
Н.А. Алексеев, И.Е. Талуть**

РАЗВИТИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА НА КАФЕДРЕ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ И АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ.

Витебский государственный
медицинский университет.

Предложены высокочувствительные способы фотометрического, флуориметрического и хроматографического (ТСХ, ГЖХ, ВЭЖХ) определения лекарственных веществ, относящихся к четвертичным аммониевым соединениям и трегичным аминам.

Широкое внедрение физико-химических методов анализа в практику работы контрольно-аналитических и судебно-химических лабораторий связано с высокой чувствительностью, селективностью и экспрессностью этих методов. Из физико-химических методов в настоящее время наиболее доступны для практического применения спектроскопические и хроматографические методы.

1. СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ.

1.1 Экстракционная фотометрия.

Спектроскопические методы анализа основаны на измерении электромагнитного излучения, поглощённого или излучаемого анализируемым раствором. При разработке способов фотометрического определения лекарственных веществ часто используются реакции образования окрашенных соединений, в том числе и реакции образования ионных ассоциатов. Применение экстракционно-фотометрических реакций позволяет анализировать сложные лекарственные формы и биологические объекты, так как органические реагенты избирательно взаимодействуют с лекарственными веществами определённой химической природы. На кафедре проводятся исследования реакций образования экстрагирующихся

ионных ассоциатов лекарственных веществ основного характера с анионными реагентами различной химической природы (сульфоталеиновые красители, азо-реагенты и др.).

Проведено сравнительное исследование ионных ассоциатов аминазина с 11 сульфоталеиновыми красителями с целью выбора оптимального реагента для экстракционно-фотометрического определения данного вещества. Установлено, что лучше экстрагируются ассоциаты с галогенсодержащими реагентами, что обусловлено их более высокой гидрофобностью. Присутствие в молекуле красителя гидрофильных групп уменьшает экстрагируемость. Например, ассоциат аминазина с пирокатехиновым фиолетовым, в молекуле которого имеется 4 фенольных гидроксила практически не экстрагируется хлороформом. Форма кривых зависимости светопоглощения экстрактов от pH согласуется с величинами pK_a фенольного гидроксила в молекуле реагента. Определены спектральные характеристики и установлен состав ассоциатов аминазина с сульфоталеиновыми красителями. В качестве оптимального реагента выбран бромкрезоловый пурпурный. Показана возможность экстракционно-фотометрического определения аминазина и других лекарственных веществ группы фенотиазина в лекарственных формах.

Метод экстракционной-фотометрии применён для количественного определения некоторых местноанестезирующих веществ (тримекаин, лидокаин). Прямое УФ-спектрофотометрическое определение этих веществ невозможно ввиду отсутствия характерных полос поглощения в области 200-400 нм. Тримекаин и лидокаин образуют ионные ассоциаты с сульфоталеиновыми реагентами (бромкрезоловый пурпурный, бромкрезоловый зелёный), хорошо экстрагирующиеся хлороформом. Значения молярных коэффициентов поглощения ионных ассоциатов $/(18-20) \cdot 10^3/$ указывает на возможность определения микроколичеств тримекаина и лидокаина.

1.2 Экстракционная флуориметрия.

Флуориметрия относится к высокочувствительным и избирательным методам анализа. Однако, только небольшое число органических соединений, в том числе и лекарственных веществ, обладает собственной флуоресценцией. На кафедре предложен способ перевода нефлуоресцирующих лекарственных веществ из группы четвертичных аммониевых соединений (ЧАС) в флуоресцирующие и обладающие интенсивной окраской ионные ассоциаты с галогенпроизводными флуоресцеина (ГПФ). Реакции образования таких ассоциатов были использованы для разработки методик экстракционно-флуориметрического и экстракционно-фотометрического определения ЧАС по биологически активной части молекулы.

Исследованы основные факторы (рН водной фазы, экстрагент, время экстракции, добавки полярных органических растворителей, концентрации реагентов, присутствие сильных электролитов), влияющие на экстракцию флуоресцирующих ионных ассоциатов декамина [3], декаметоксина [8], этония [14], берберина [21] и квалидила с галогенпроизводными флуоресцеина. ЧАС с короткими углеводородными радикалами, например, камфоний, прозерин, метацин не образуют экстрагирующихся ионных ассоциатов с ГПФ. Установлено, что добавление в водную фазу полярных органических растворителей приводит к значительному увеличению светопоглощения и интенсивности флуоресценции хлороформных экстрактов, что вызвано усилением экстрагируемости ассоциатов. Обнаружено и объяснено различное влияние спиртов и апротонных полярных органических растворителей (ацетон, ацетонитрил, диметилформамид) на экстракцию ассоциатов декамина и квалидила [17]. Изучены основные химико-аналитические свойства (спектры поглощения и флуоресценции, молярные коэффициенты светопоглощения, квантовые выходы флуоресценции, экстрагируемость) ассоциатов. Методами физико-химического анализа установлено, что хлороформом из водно-этанольной среды

экстрагируются, главным образом, ассоциаты бис-ЧАС:ГПФ=1:1 и моно-ЧАС:ГПФ=1:1, в состав которых входят, соответственно, ди- и моноанион реагента. Показано, что соотношение компонентов в экстрагирующихся ассоциатах бис-ЧАС с ГПФ отличается от наблюдающегося для ассоциатов, преимущественно образующихся в водной фазе.

Установлено, что наиболее чувствительным реагентом для экстракционно-фотометрического определения ЧАС является эозин (молярные коэффициенты светопоглощения образующихся ассоциатов составляют $(6,5-11,3) \cdot 10^4$, предел обнаружения 0,05-0,17 мкг/мл). Для экстракционно-флуориметрического определения возможно использование как эозина, так и флоксина А (предел обнаружения 0,03-0,05 мкг/мл).

Разработаны высокочувствительные методики количественного определения декамина, этония, декаметоксина, квалидила, берберина бисульфата в лекарственных препаратах, а также декамина и берберина бисульфата в крови и моче. Министерством здравоохранения Республики Беларусь утверждены методические указания: «Определение берберина в биологических жидкостях фотометрическим методом» и «Определение этония в растворах аптечного изготовления фотометрическим методом».

1.3 Безэкстракционная фотометрия.

Перспективным является разработка способов безэкстракционного фотометрического определения биологически активных веществ основного характера с применением реагентов, относящихся к сульфоталеиновым красителям, галогенпроизводным флуоресцеина, триоксифлуоронам [5-7, 13, 15, 16].

Предложен новый способ фотометрического определения азотсодержащих лекарственных веществ путём перевода их в окрашенные ассоциаты с оксиксантоновыми красителями. Способы определения арпена, декаметоксина, декамина, динезина, диплацина, квалидила, оксазила, октатиона, этония защищены авторскими свидетельствами.

Исследовано влияние природы азотсодержащих лекарственных веществ и оксиксантеновых красителей на комплексообразование. Состояние третичных аминов в растворе, в отличие от ЧАС, зависит от pH, так как третичные амины являются слабыми основаниями. Поэтому различие в реакционной способности четвертичных аммониевых соединений и третичных аминов проявляется при $\text{pH} > 6$, так как в этих условиях третичные амины находятся в растворе в виде неионизированных молекул. Взаимодействие ЧАС с оксиксантеновыми реагентами происходит по функционально-аналитической ОН-группе, входящей в цепь сопряжения. Отсутствие или этерификация карбоксильной группы не оказывает значительного влияния на комплексообразование. Результаты ИК-спектроскопического исследования указывают на участие ОН-группы эозина в комплексообразовании. В этом случае происходит максимальная делокализация π -электронной системы реагента и наблюдается батохромное смещение длинноволновой полосы поглощения. Связь между молекулами ЧАС и оксиксантеновых красителей осуществляется за счёт электростатических взаимодействий между хромофорной системой с делокализованным отрицательным зарядом (HR^-) и фрагментом ЧАС, несущим положительный заряд. Определённую роль играет донорно-акцепторное взаимодействие и гидрофобность. Проведённые термодинамические исследования показали высокие значения энтальпии и энтропии комплексообразования азотсодержащих лекарственных веществ с оксиксантеновыми красителями, что свидетельствует о большой прочности ассоциатов.

Теоретически обосновано применение оксиксантеновых красителей в качестве высокочувствительных реагентов для безэкстракционного фотометрического определения некоторых групп азотсодержащих лекарственных веществ. Созданы унифицированные методики количественного определения азотсодержащих лекарственных веществ в готовых лекарственных формах. Разработанные методики опреде-

ления декамина, декаметоксина и квалидила используются при контроле качества лекарственных веществ, выпускаемых химико-фармацевтическими заводами России и Украины.

На основании результатов квантово-химических расчётов электронных спектров азореагентов (люмогаллион, сульфонафтолазорезорцин) установлено, что в состав ассоциатов входят молекулы люмогаллиона, сульфонафтолазорезорцина, ионизированные по гидроксильным группам, расположенным в о-положении к азогруппе. Рассчитанные максимумы электронных спектров ассоциатов согласуются с максимумами электронных спектров ассоциатов этония с исследованными реагентами.

Обнаружена высокая контрастность цветной реакции этония с бромтимоловым синим (величина батохромного смещения максимума длинноволновой полосы спектра составляет 180 нм). Обнаружению этония не мешают 14 исследованных близких по строению четвертичных аммониевых соединений.

Исследованы триоксифлуоронатные ассоциаты декамина и этония [4, 18]. Чувствительность реакций зависит от химической природы реагентов: наиболее чувствительными реагентами являются салицил- и о-нитрофенилфлуорон.

2. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ.

2.1 ТСХ.

Вторая половина XX века ознаменована интенсивным развитием и внедрением хроматографических методов анализа. Наиболее доступными являются различные виды плоскостной хроматографии. Особую сложность представляет разделение высокополярных соединений (четвертичные аммониевые соединения), которые прочно адсорбируются на силикагеле и других адсорбентах. Показано [11], что ЧАС (прозерин, дитилин, квалидил, бензогексоний, камфоний, метацин, берберин, оксазил и др.) имеют удовлетворительные хроматографические характеристики при использовании в качестве подвижных фаз смеси водного раствора неорганических солей с полярными органическими раство-

рителями (ацетон, диоксан, этанол, ацетонитрил). Удерживание ЧАС в данных системах увеличивается с уменьшением радиуса аниона и концентрации неорганической соли в подвижной фазе. Рассчитаны оптимальные концентрации противоиона для исследования лекарственных веществ группы ЧАС. Разработана система ТСХ-скрининга для 22 ЧАС с использованием подвижной фазы - 0,03-0,14 моль/л водный раствор перхлората натрия - этанол - хлороформ (1:5:1) [1]. Разработаны методики определения примеси тиамин-дифосфата, а также прозерина и его метаболита в биологических жидкостях методом ТСХ.

2.2 ГЖХ.

Газовая хроматография относится к высокочувствительным и селективным методам анализа органических веществ. Низкая летучесть и высокая полярность ЧАС является препятствием на пути разработки методик газохроматографического определения лекарственных веществ группы ЧАС. Одним из путей решения этой проблемы является использование реакции селективного деалкилирования при действии различных реагентов (фенилсульфид натрия, боргидрид натрия в присутствии солей Ni^{2+} и др.), а также деметилирование в испарителе хроматографа. Нами установлено, что при температуре испарителя выше 250°C прозерин деметилируется до 3-N,N-диметиламинофенилового эфира N',N'-диметилкарбаминовой кислоты (дезметилпрозерина). Определены оптимальные условия для хроматографирования дезметилпрозерина на силиконовых неподвижных жидких фазах, определены термодинамические характеристики удерживания данного соединения. Установлено, что основной вклад (около 90%) в удерживание дезметилпрозерина на 5% SE-30 вносит растворение, что свидетельствует о высокой селективности данной группы неподвижных жидких фаз [10]. Разработана методика анализа биологических объектов (моча, кровь, почка, печень) на наличие прозерина, сочетающая сорбционное выделение (твёрдофазная экс-

тракция из биологических жидкостей, твёрдо-фазная матричная дисперсия из биологических тканей) прозерина и его газохроматографическое определение с термоионным детектором (нижняя граница определяемых концентраций прозерина в моче составляет 10 нг/мл, в крови 100 нг/мл, в почке и печени - 0,25 мкг/г) [9].

2.3 ВЭЖХ.

Высокоэффективная жидкостная хроматография является в настоящее время одним из самых эффективных методов определения лекарственных веществ в различных объектах [12]. Исследованы хроматографические характеристики некоторых лекарственных веществ группы ЧАС с использованием в качестве сорбента химически модифицированных кремнезёмов с привитыми октадецильными группами. Установлено, что удерживание ЧАС в данных системах (подвижная фаза: водный раствор KH_2PO_4 - ацетонитрил) удовлетворительно описываются моделями Скотта-Кучеры и Снайдера-Сочевиньского. Удерживание ЧАС зависит также от концентрации дигидрофосфата калия и описывается уравнением линейной регрессии ($\lg k' = a \cdot \lg C^{-1} + b$, где a и b - коэффициенты, k' - коэффициент емкости, C - концентрация KH_2PO_4 в подвижной фазе, моль/л). Введение в подвижную фазу ионных реагентов (алкилсульфонатов) увеличивает удерживаемые объёмы и эффективность разделения ЧАС, при этом наиболее значительное увеличение объёмов удерживания для всех ЧАС происходит при введении в ПФ додецилсульфоната натрия. Разработаны методики определения берберина в моче и тиамин-дифосфата в сложных лекарственных формах методом ВЭЖХ, отличающиеся высокой эффективностью разделения, экспрессностью и селективностью [2].

3. СОРБЦИОННОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ И КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ.

При идентификации и количественном определении лекарственных веществ в процессе химико-токсикологического анализа и фармакокинетических исследова-

ний необходимо предварительное выделение веществ, а иногда и концентрирование. На кафедре значительное внимание уделяется решению вопросов пробоподготовки при анализе лекарственных средств и биологических объектов. В этом направлении наряду с экстракционным выделением органических веществ получают развитие способы сорбционного изолирования и концентрирования. Сорбционное концентрирование в настоящее время является одним из эффективных методов выделения различных веществ из сложных матриц. На кафедре проводятся работы по исследованию сорбционного поведения лекарственных веществ группы четвертичных аммониевых соединений и третичных аминов на немодифицированных кремнеземах (Силохромы С-80, С-120, силикагель КСМ-5, Силикагель L), целлюлозе, карбоксиметилцеллюлозе и химически модифицированных кремнеземах (ХМК) с привитыми гексадецильными и октильными группами (ХМК-С₁₆, ХМК-С₈). Сорбенты с привитыми неполярными группами (ХМК-С₁₆, ХМК-С₈) характеризуются высокими значениями коэффициентов распределения, но не позволяют получать чистые извлечения из биожидкостей. Сорбция изучаемой группы лекарственных веществ на карбоксиметилцеллюлозе сильно зависит от рН среды (максимальная сорбция достигается при рН>6) и резко падает при увеличении ионной силы выше 0,01 [19].

Перспективным оказалось использование немодифицированных кремнезёмов, которые отличаются высокой скоростью установления сорбционного равновесия, обратимостью сорбционных процессов, ненабухаемостью. Наибольшим сродством к данной группе сорбентов обладают ЧАС (берберин, прозерин), степень извлечения которых достигает 98-99 % в диапазоне рН от 1 до 10 и не зависит от ионной силы раствора. Третичные амины (новокаин, аминазин, папаверин, хинин) максимально сорбируются при рН 6-8 и характеризуются высокими коэффициентами распределения (порядка 10²-10³ мл/г), что требует дальнейшего изучения сорбционного кон-

центрирования и выделения этих веществ из биологических жидкостей с помощью данной группы сорбентов [20].

ЛИТЕРАТУРА:

1. Алексеев Н.А. Определение четвертичных аммониевых соединений в биологических объектах методом ТСХ-скрининга // Проблемы теоретической медицины и фармации. Сб. науч. трудов. - Витебск, 1997. - С. 119 - 121.
2. Алексеев, А.И. Жебентяев. Определение тиамина в лекарственных формах методом ион-парной ВЭЖХ // Вестник фармации - 1999. - № 1-2. - С. 14 - 18
3. Взаимодействие оксиксантеновых красителей с катионами в двухфазной системе. Экстракционно-флуориметрическое определение декамина с флоксином А / А.И. Жебентяев, А.К. Жерносек, С.И. Егорова, Н.О. Мчедлов-Петросян // Журн. аналит. химии. - 1997. - Т. 52, № 9. - С. 946-953.
4. Жебентяев А.И. Изучение производных триоксифлуорона как реагентов для спектрофотометрического определения декамина // Журн. аналит. химии. - 1981. - Т. 36, № 3. - С. 543 - 546.
5. Жебентяев А.И. Спектрофотометрическое определение 1,2-этилен-(N-диметилкарбдецилоксиметил)аммония дихлорида // Весці АН Беларусі. Сер. хім. навук. - 1981, № 5. - С. 63 - 65.
6. Жебентяев А.И. Спектрофотометрическое определение декаметоксина с эозином // Изв. вузов. Химия и хим. технология. - 1984. - Т. 27, № 4. - С. 412 - 414.
7. Жебентяев А.И. Спектрофотометрическое определение квалидила // Фармация. - 1983. - Т. 32, № 3. - С. 48 - 49.
8. Жебентяев А.И., Жерносек А.К. Способ флуориметрического определения декаметоксина // Весці АН Беларусі. Сер. хім. навук. - 1995, № 4. - С. 8-12.
9. Жебентяев А.И., Алексеев Н.А. Определение прозерина в биологических жидкостях // Фармация. - 1999. - Т. 48, № 1. - С. 16 - 18.
10. Жебентяев А.И., Алексеев Н.А. Газо-хроматографические свойства продукта

деметилования прозерина и определение содержания прозерина в биологических жидкостях // Весці АН Беларусі. Сер. хім. навук. - 1999. - № 1. - С. 21 - 25.

11. Жебентяев А.И., Алексеев Н.А. Ион-парная тонкослойная хроматография лекарственных препаратов, производных четвертичных аммониевых соединений // Фармация. - 1998. - Т. 47, № 1. - С. 21 - 27.

12. Жебентяев А.И., Алексеев Н.А. Разделение четвертичных аммониевых соединений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Вестник фармации. - 1998. - № 1. - С. 41 - 47.

13. Жебентяев А.И., Дуксина С.Г., Волкова Н.А. Фотометрическое определение этмозина в таблетках // Хим. - фарм. журн. - 1989. - Т. 23, № 2. - С. 245 - 247.

14. Жебентяев А.И., Жерносек А.К. Химико-аналитические свойства флуоресцирующих ассоциатов этония с галогенпроизводными флуоресцеина // Весці АН Беларусі. Сер. хім. навук. - 1996, № 2. - С. 18-24.

15. Жебентяев А.И., Мчедлов-Петросян Н.О. Взаимодействие биологически активных четвертичных аммониевых солей с эозиновыми красителями // Журн. аналит. химии. - 1987. - Т. 43, № 5. - С. 518 - 524.

16. Жебентяев А.И., Талуть И.Е. Спектрофотометрическое исследование диплацина с эозином // Журн. аналит. химии. - 1989. - Т. 45, № 1. - С. 135 - 138.

17. Жерносек А.К., Жебентяев А.И. Влияние полярных органических растворителей на экстракцию ассоциатов четвертичных аммониевых соединений с галогенпроизводными флуоресцеина // Весці АН Беларусі. Сер. хім. навук. - 1997, № 1. - С. 11-15.

18. Пилипенко А.Т., Жебентяев А.И. Фо-

тометрическое определение этония с дисульфобензилфлуороном // Укр. хим. журн. - 1983. - Т. 49, № 1. - С. 45 - 47.

19. Талуть И.Е., Алексеев Н.А. Изучение сорбции берберина, декамина, новокаина и аминазина на немодифицированных кремнезёмах // Фундаментальные и прикладные вопросы медицины и фармации. Тезисы докл. 54-й научной сессии института. - Витебск, 1999. - С. 182.

20. Талуть И.Е., Жебентяев А.И., Алексеев Н.А. Изучение сорбционных характеристик некоторых четвертичных аммониевых соединений и третичных аминов на немодифицированных кремнезёмах // Проблемы современной медицины и фармации. Тезисы докл. 53-й научной сессии института. - Витебск, 1998. - С. 180.

21. Zhebentyaev A.I., Zhernosek A.K. Extraction-spectrophotometric determination of berberine sulfate in tablets using eosin as a reagent // Pharmazie. - 1996. - Bd. 51, N 4. - S. 252.

SUMMARY

A.I. Zhebentyaev, A.K. Zhernosek,
N.A. Alekseev, I.E. Talut

DEVELOPMENT OF PHYSICO-CHEMICAL METHODS OF ANALYSIS AT THE DEPARTMENT OF TOXICOLOGICAL AND ANALYTICAL CHEMISTRY.

Highly sensitive procedures for photometric, fluorimetric and chromatographic determination of medicinal substances from quaternary ammonium compounds and tertiary amines groups are proposed.